

UTILISATION PRÉVUE

Le système de test ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG à l'antigène nucléaire-1 du virus Epstein-Barr (EBNA-1) a été conçu pour la détection qualitative d'anticorps de classe IgG à l'antigène nucléaire-1 du virus Epstein-Barr (EBNA-1) dans un échantillon de sérum sanguin humain. Quand il est réalisé selon les recommandations, les résultats de ce test corrélés à d'autres tests comme le test hétérophile, ainsi que les tests EBV-VCA IgG et IgM, peuvent aider au diagnostic ou fournir des informations sur l'état d'une mononucléose infectieuse (MNI), lesquelles peuvent faciliter la gestion et le traitement des patients. Ce test a été conçu pour des diagnostics *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est responsable de la mononucléose infectieuse (MNI), une maladie auto-limitative lymphoproliférative (1). L'EBV est un virus ubiquitaire de l'homme. À l'âge adulte presque tout le monde a été infecté et a développé une immunité contre ce virus. Dans les pays sous-développés, la séroconversion au virus a lieu dans la petite enfance et est généralement asymptomatique (2). Dans les pays plus riches, les infections EBV sont souvent retardées jusqu'à l'adolescence, voire plus tard, pour se manifester sous forme de MNI chez environ 50 % des personnes de ce groupe d'âge (3, 4 et 5).

Après la séroconversion, symptomatique ou non, l'EBV provoque une infection latente chronique à lymphocytes B qui dure probablement toute la vie (6). L'EBV se réplique dans les cellules épithéliales oropharyngées et est présent dans la salive de la plupart des patients ayant une MNI (7). Ainsi, 10-20 % des personnes en bonne santé qui sont positives aux anticorps EBV excrètent le virus dans leurs sécrétions orales (6,8). La réactivation du porteur viral à l'état latent, comme en témoigne l'augmentation de l'excrétion virale, peut être induite par l'immunosuppression, la grossesse, la malnutrition ou la maladie (8, 9). Les infections chroniques par EBV, soient latentes ou actives, sont rarement associées à la maladie. Cependant, l'EBV a été impliqué en tant que facteur aggravant dans l'étiologie du carcinome du nasopharynx, le lymphome de Burkitt et les lymphomes chez les patients immunodéprimés (4,8). De récents rapports suggèrent que l'EBV peut provoquer un syndrome de fatigue chronique chez certaines personnes (9-12).

Le test de Paul-Bunnell-Davidsohn (détection d'anticorps hétérophiles) est hautement spécifique pour la MNI (13). Cependant, 10-15 % des adultes, et un pourcentage plus élevé d'enfants et de nourissons avec des infections primaires à EBV, ne développent pas d'anticorps hétérophiles (14). Des tests sérologiques spécifiques à l'EBV sont nécessaires pour différencier les infections primaires à EBV dites hétérophiles négatives, des maladies de type mononucléose causées par d'autres agents en recherchant le cytomégalovirus, l'adénovirus et le *Toxoplasma gondii* (4).

Les titres d'anticorps contre les antigènes EBV spécifiques sont en corrélation avec les différentes étapes de la MNI (4, 13-15). Les deux anticorps IgM et IgG contre l'antigène de la capsid virale (VCA) atteignent un pic 3 à 4 semaines après l'infection à l'EBV. Les taux d'IgM anti-VCA diminuent rapidement et sont habituellement indétectables après 12 semaines. Les titres d'IgG anti-VCA diminuent lentement après avoir atteint un pic et peuvent durer indéfiniment. Les anticorps dirigés contre le composant D des antigènes précoces EA peuvent apparaître de manière transitoire pendant une durée maximale de trois mois durant la phase aigüe de la MNI chez 85 % des patients (15). Les anticorps dirigés contre le composant R des antigènes précoces EA peuvent apparaître de manière transitoire pendant une convalescence tardive (15). Les titres d'anticorps dirigés contre le composant R des EA peuvent être associés à une réactivation du porteur du virus à l'état latent (9, 15-20).

Contrairement aux anticorps VCA et EA, les anticorps EBV dirigés contre les antigènes nucléaires (EBNA) sont rarement présents lors de la phase aigüe de la MNI, mais se développent pendant la convalescence (15, 21). Les anticorps EBNA augmentent progressivement en titre et, au bout de 3 mois à 1 an, atteignent un niveau stable où ils restent toute la vie chez la plupart des individus (15, 21). Par conséquent, la présence d'anticorps anti-EBNA indique que l'infection par EBV est ancienne.

Bien que le test classique d'immunofluorescence anti-complément (ACIF) (27) ait été employé pour mesurer les anticorps EBNA chez l'homme, des méthodes ELISA sont devenues récemment disponibles. Les méthodes ELISA utilisant des antigènes EBNA purifiés, ont montré des titres plus élevés qu'en dosages ACIF et ces titres sont même indétectables par ACIF chez certains patients atteints de MNI (28,29, 30).

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG à EBNA-1 a été conçu pour la détection qualitative d'anticorps de classe IgG à l'antigène nucléaire-1 du virus Epstein-Barr (EBNA-1) dans un échantillon de sérum sanguin humain. Les puits des barrettes à micro-puits plastiques sont sensibilisés par une absorption passive d'antigène à EBNA-1. La procédure de test comprend trois étapes d'incubation :

1. Les échantillons de sérum sanguin du test (correctement dilués) sont incubés dans des micropuits enduits d'antigène. Tout anticorps spécifique de l'antigène se trouvant dans le sang s'accrochera à l'antigène immobilisé. La plaque est lavée de façon à enlever les anticorps non fixés et les autres composants sériques.
2. Des IgG antihumaines de chèvre conjuguées à de la peroxydase sont ajoutées dans les puits et la plaque est incubée. Le conjugué réagira avec les anticorps IgG immobilisés sur la phase solide de l'étape 1. Les puits sont lavés pour enlever le conjugué n'ayant pas réagi.
3. Les micropuits contenant du conjugué de peroxydase immobilisé sont incubés avec une solution de substrat peroxydase. L'hydrolyse du substrat avec de la peroxydase produit un changement de couleur. Après un certain temps, la réaction est arrêtée et l'intensité de la couleur de la solution est mesurée par photométrie. L'intensité de la couleur de la solution dépend de la concentration d'anticorps dans l'échantillon d'origine.

COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

Matériel inclus :

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement.

REMARQUE : Les composants suivants contiennent de l'azote de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : contrôles, étalons et SAVE Diluant®.

Composant	Σ_{96}	Σ_{480}	Description
PLATE	1	5	Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits, enduits de peptides recombinant d'EBNA-1. Les bandes sont emballées dans un porte-bandes et placées avec du desséchant dans une enveloppe hermétiquement fermée.
CONJ	1	5	Conjugué : Solutions d'IgG de chèvre anti-humaine conjuguée à de la peroxydase de raifort, flacons de 15 ml à bouchon blanc. Prêt à l'emploi.
CONTROL +	1	2	Contrôle positif (sérum humain) : Ampoule(s) de 0,35 ml avec bouchon rouge.
CAL	1	4	Étalon (sérum humain) : Ampoule(s) de 0,5 ml avec bouchon bleu.
CONTROL -	1	2	Contrôle négatif (sérum humain) : Ampoule(s) de 0,35 ml avec bouchon vert.
DIL SPE	1	4	SAVE Diluant® : Flacon(s) de 30 ml à bouchon vert contenant du Tween-20, de l'albumine de sérum bovin et tampon phosphate salin. Prêt à l'emploi. REMARQUE : La solution SAVE Diluant® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.

SOLN	TMB	1	5	TMB : Flacon(s) de 15 ml à bouchon ambre contenant du tétraméthyl-3, 3', 5, 5'-benzidine (TMB). Prêt à l'emploi.
SOLN	STOP	1	3	Solution d'arrêt : Flacon(s) de 15 ml à bouchon rouge contenant du 1M H ₂ SO ₄ , 0,7M HCl. Prêt à l'emploi.
WASHBUF	10X	1	5	Tampon de lavage concentré (10 x) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou déionisée. Flacon(s) de 100 ml à bouchon transparent contenant une solution de Tween 20 et un tampon phosphate salin concentré 10 x (solution bleue). REMARQUE : La solution 1 x présente un pH de 7,2 ± 0,2.

REMARQUES :

1. Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ZEUS ELISA : TMB, solution d'arrêt et tampon de lavage. La solution SAVE Diluent® peut être interchangée dans n'importe quel système de test ZEUS ELISA avec le produit n° 005CC.
2. Le système de test contient également une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.

PRÉCAUTIONS

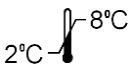
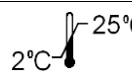
1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. Les puits de la plaque ELISA ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, les bandes doivent être considérées comme des **matériaux biologiques dangereux** et être manipulées en conséquence.
4. Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (30).
5. Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20–25 °C) avant de commencer le test. Les réactifs non utilisés doivent être retournés à une température de réfrigération immédiatement après utilisation.
6. Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution de lavage résiduelle (p. ex. par absorption ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué ou le substrat. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
7. La solution SAVE Diluent®, les solutions de contrôle et la solution étalon contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azoture de sodium.
8. L'inhalation, l'ingestion et le simple contact cutané de la solution d'arrêt peuvent avoir des effets TOXIQUES, notamment des brûlures. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.
9. La solution TMB est nocive. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
10. Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
11. Essuyer le fond de la plaque de façon à enlever les empreintes digitales et les résidus de liquide pouvant fausser les mesures de densité optique.
12. La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
13. Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
14. La solution TMB doit être incolore, jaune très pâle, vert très pâle ou bleu très pâle lors de son utilisation. Une contamination de la solution TMB avec du conjugué ou d'autres oxydants peut causer un changement de couleur prématuré. Ne pas utiliser la solution TMB si elle est nettement bleue.
15. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
16. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
17. Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
18. Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
19. Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
20. Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
21. Laisser les bandes de micropuits et le support arriver à température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice, afin de protéger les puits de toute condensation.
22. Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
23. Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
24. Ne jamais utiliser une plaque ELISA dont la bande indicatrice du sachet de déshydratant est passée du bleu au rose.
25. Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azoture de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azoture de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
26. Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Lecteur de micropuits ELISA pouvant lire des mesures avec des longueurs d'ondes de 450 nm. **REMARQUE: il est possible d'utiliser un lecteur à longueur d'onde unique (450 nm) ou à longueur d'onde double (450/620 - 650 nm). L'utilisation d'un lecteur à longueur d'onde double est préférable, puisqu'il a été établi que le filtre de référence supplémentaire réduisait l'interférence potentielle provenant d'anomalies susceptibles d'absorber la lumière.**
2. Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 – 200 µl.
3. Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 50 – 200 µl.
4. Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
5. Flacon de lavage ou système de lavage de micropuits.
6. Eau distillée ou déionisée.
7. Cylindre gradué d'un litre.
8. Pipettes sérologiques.
9. Embouts de pipettes jetables.
10. Serviettes en papier.
11. Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.

12. Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Bandes de micropuits avec revêtement : Refermer immédiatement de façon hermétique le sachet de bandes non utilisées en y laissant le déshydratant et replacer le sachet dans un environnement de stockage approprié. Après l'ouverture du sachet, les bandes demeurent stables pendant 60 jours, tant que les bandes indicatrices du sachet de déshydratant demeurent bleues.
	Conjugué – NE PAS CONGELER.
	Système de test non ouvert, étalon, contrôle positif, contrôle négatif, solution TMB, solution SAVe Diluent®
	Solution d'arrêt : 2 - 25°C Tampon de lavage (1 x) : 20 - 25°C pendant un maximum de 7 jours; 2 - 8 °C pendant un maximum de 30 jours. Tampon de lavage (10 x) : 2 - 25°C

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

1. ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* » (dernière édition).
2. Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
3. Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (28, 29). Ne pas utiliser si un anticoagulant ou un agent de conservation a été ajouté. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.
4. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 – 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (31).

PROCÉDURE D'ESSAI

1. Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 – 25 °C).
2. Déterminer le nombre de micropuits nécessaires. Prévoir six déterminations de contrôle/étalon (un blanc réactif, un contrôle négatif, trois étalons et un contrôle positif) par série. Exécuter un blanc réactif pour chaque analyse. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées contrôles/étalon. Replacer les bandes inutilisées dans le sachet en y laissant le déshydratant, puis fermer hermétiquement le sachet et conserver à 2 – 8 °C.

EXEMPLE DE CONFIGURATION DE PLAQUE		
	1	2
A	Blanc	Patient 3
B	Contrôle négatif	Patient 4
C	Étalon	etc.
D	Étalon	
E	Étalon	
F	Contrôle positif	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

3. Préparer une dilution 1:21 (p. ex. 10 µl de sérum + 200 µl de SAVe Diluent®) de contrôle négatif, d'étalon, de contrôle positif et de sérum de chaque patient.
REMARQUE : La solution SAVe Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.
4. Dans les puits individuels, ajouter 100 µl de contrôle, d'étalon et d'échantillon de patient (solutions diluées). S'assurer que les échantillons sont correctement mélangés. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.
5. Ajouter 100 µl de solution SAVe Diluent® dans les puits A1 comme blanc réactif. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées de puits de blanc réactif.
6. Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
7. Laver les bandes de micropuits 5 fois.
 - a. **Procédure de lavage manuel :**
 1. Secouer vigoureusement pour faire sortir le liquide des puits.
 2. Remplir chaque micropuits de tampon de lavage. S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans les puits.
 3. Répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à un total de 5 lavages.
 4. Secouer vigoureusement pour faire sortir la solution de lavage de tous les puits. Inverser la plaque sur une serviette en papier et donner des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits. Inspecter visuellement la plaque pour s'assurer qu'il ne reste aucun résidu de solution de lavage. Récupérer la solution de lavage dans un bassin jetable et traiter avec un désinfectant à la fin des procédures de la journée.
 - b. **Procédure de lavage automatisé :**

Si un système automatisé de lavage de micropuits est utilisé, régler le volume distribué à 300 – 350 µl par puits. Programmer un cycle de 5 lavages sans délai entre les lavages. Si nécessaire, la plaque de micropuits peut être retirée de l'appareil de lavage, puis inversée sur une serviette en papier et recevoir des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits.
8. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
9. Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
10. Laver les micropuits conformément à la procédure décrite dans l'étape 7.
11. Ajouter 100 µl de TMB dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
12. Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 10 ± 15 minutes.
13. Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons. Les échantillons positifs passeront du bleu au jaune. Après avoir ajouté la solution d'arrêt, taper plusieurs fois sur la plaque pour que les échantillons soient bien mélangés.
14. Programmer le lecteur de micropuits pour lire avec une longueur d'onde de 450 nm et mesurer la densité optique de chaque puits par rapport au blanc réactif. Lire les résultats de la plaque moins de 30 minutes après avoir ajouté la solution d'arrêt.

RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE D'ANALYSE

1. Diluer le sérum 1:21.
2. Ajouter l'échantillon dilué dans les micropuits à raison de 100 µl/puits.
3. —————→ Incuber 25 ± 5 minutes.
4. Laver.
5. Ajouter le conjugué – 100 µl/puits.
6. —————→ Incuber 25 ± 5 minutes.

7. Laver.
8. Ajouter le TMB – 100 µl/puits.
9. $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Incuber 10 - 15 minutes.
10. Ajouter la solution d'arrêt, 50 µl/puits – Mélanger.
11. LIRE les résultats dans les 30 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Chaque fois qu'une analyse est exécutée, l'étalon doit être exécuté en trois exemplaires. Un blanc réactif, un contrôle négatif et un contrôle positif doivent également être inclus.
2. Calculer la moyenne des trois puits d'étalon. Si une des trois valeurs est à plus de 15 % de la moyenne, éliminer cette valeur et recalculer la moyenne avec les deux puits restants.
3. Les valeurs de densité optique (DO) moyenne de l'étalon, du contrôle positif et du contrôle négatif devraient se situer dans les plages suivantes :

	Plage DO
Contrôle négatif	≤0.250
Étalon	≥0.300
Contrôle positif	≥0.500

- a. La DO du contrôle négatif divisé par la DO moyenne de l'étalon devrait être ≤0,9.
- b. La DO du contrôle positif divisé par la DO moyenne de l'étalon devrait être ≥1,25.
- c. Si les conditions ci-dessus ne sont pas satisfaites, le test est invalide et doit être répété.
4. Le contrôle positif et le contrôle négatif servent à détecter une anomalie de réactif substantielle, mais ne garantissent pas la précision à la fin de l'analyse.
5. Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes.
6. Le document C24 du CLSI intitulé « *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures* » contient des informations supplémentaires sur les procédures appropriées de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Calculs :

- a. **Facteur de correction** : Le fabricant a déterminé une valeur seuil de densité optique pour les échantillons positifs et l'a corrélée au étalon. Le facteur de correction (FC) permet de déterminer la valeur seuil des échantillons positifs. Il permet également de compenser les légères variations de résultats d'un jour à l'autre. Le facteur de correction est déterminé pour chaque lot de composants et est imprimé sur l'étiquette de composants située sur la boîte du système de test.
- b. **Valeur seuil de densité optique** : Pour obtenir la valeur seuil de densité optique, multiplier le FC par la DO moyenne du étalon, déterminée ci-dessus.
($FC \times DO \text{ moyenne du étalon} = \text{Valeur seuil de DO}$)
- c. **Rapports valeur d'indice/DO** : Calculer le rapport valeur d'indice/DO de chaque échantillon en divisant sa valeur de DO par la valeur seuil de DO de l'étape b.

Exemple :	DO moyenne de l'étalon	=	0,793
	Facteur de correction (FC)	=	0,25
	Valeur seuil de DO	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO inconnue de l'échantillon	=	0,432
	Rapports valeur d'indice/DO de l'échantillon	=	$0,432 / 0,198 = 2,18$

2. **Interprétations** : Les rapports valeur d'indice/DO sont interprétés de la manière suivante.

	Rapport valeur d'indice/DO
Échantillons négatifs	≤0,90
Échantillons ambivalents	0,91 – 1,09
Échantillons positifs	≥1,10

- a. Un rapport de DO égal ou inférieur à 0,90 signifie qu'il n'a pas été possible de détecter une quantité significative d'anticorps IgG dirigés contre EBNA-1. Un résultat négatif signifie une absence d'infection à l'EBV actuelle ou passée. Ces personnes sont présumées être sensibles à l'infection primaire.
- b. Un rapport DO égal ou supérieur à 1,10 signifie que des anticorps IgG spécifiques à EBNA-1 ont été détectés, ce qui signifie une infection antérieure à l'EBV.
- c. Refaire deux fois le test sur les échantillons lorsque les rapports de DO sont dans la zone d'ambivalence (0,91 – 1,09). Le résultat final sera obtenu dès que deux mesures concordantes seront observées. Évaluer répétitivement les échantillons ambivalents avec une autre méthode sérologique et/ou reprendre l'évaluation en prélevant d'autres échantillons une à trois semaines plus tard.

LIMITES DE L'ESSAI

1. Un diagnostic ne devrait pas être fait sur la base des résultats anti-EBNA seuls. Les résultats des tests anti-EBNA-1 doivent être interprétés en conjonction avec les résultats des tests des autres antigènes EBV spécifiques (VCA-IgG, VCA-IgM et de l'antigène précoce (EA)).
2. Interpréter les résultats de test conjointement avec l'évaluation clinique et avec les résultats d'autres procédures de diagnostic.
3. Les patients sévèrement immunodéprimés pourraient donner des résultats négatifs pour les anticorps EBNA même si des anticorps VCA sont présents (28). De la même façon, une réponse anti-EBNA peut se développer chez les patients qui ont un déficit immunitaire ou qui sont immunodéprimés (22, 26).
4. Ce test détecte les anticorps antigène EBNA-1 et pas d'autres antigènes EBNA.
5. Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été établies pour le lymphome de Burkitt, le carcinome du nasopharynx et les syndromes lymphoprolifératifs. Ce test doit être employé dans le diagnostic des mononucléoses infectieuses associées à l'EBV.

RÉSULTATS ESPÉRÉS

Dans une mononucléose infectieuse classique associée à l'EBV, les deux anticorps VCA-IgG et VCA-IgM augmentent généralement rapidement après l'apparition de la maladie et atteignent des pics en même temps que l'apparition des symptômes cliniques. Les anticorps EBNA sont normalement absents durant la phase aiguë de la MNI ou sont présents à un titre très faible (14,15). Les anticorps EBNA atteignent un pic 3 à 12 mois après le début de la MNI et restent toute la vie chez la plupart des individus (21). Le titre peut varier selon les tests utilisés. Les anticorps anti-EBNA, associés à la présence d'anticorps VCA-IgG et l'absence d'anticorps VCA-IgM indique une infection passée à EBV (14, 15). La primo-infection aiguë à EBV est indiquée par la présence d'anticorps VCA-IgG, d'anti-EA et/ou d'anticorps VCA-IgM, et l'absence d'anticorps EBNA. Bien que les anticorps EBNA au cours des 3 premiers mois de la MNI soient principalement dirigés contre l'EBNA-2, la plupart des cas de MNI sont également associés à EBNA-1 avec de rares exceptions (31). Les anticorps EBNA-1 apparaissent tardivement au cours de la maladie et persistent pendant des années. Presque tous les sérums humains contenant des anticorps à EBNA reconnaissent l'antigène EBNA-1 (30, 31). La présence des anticorps EBNA dans la population générale varie avec l'âge. Les infections à EBV se produisent principalement avant l'âge de 3 ans ou pendant l'adolescence (de 13 à 20 ans) principalement en fonction des conditions socio-économiques. L'incidence de l'infection entre l'âge de 3 et 13 ans est sporadique et elle est rare après 30 ans. La prévalence des anticorps EBNA est pratiquement de 100% à l'âge de 30 ans (33). Une étude a été réalisée pour déterminer les taux de réactivité sur deux populations asymptomatiques du sud-est des États-Unis (n=72 et n=85). Les taux de résultats positifs étaient respectivement de 97,2 % et 91,8 %. En outre, la figure 1 indique la distribution de fréquence des résultats de la recherche clinique décrite ci-dessous.

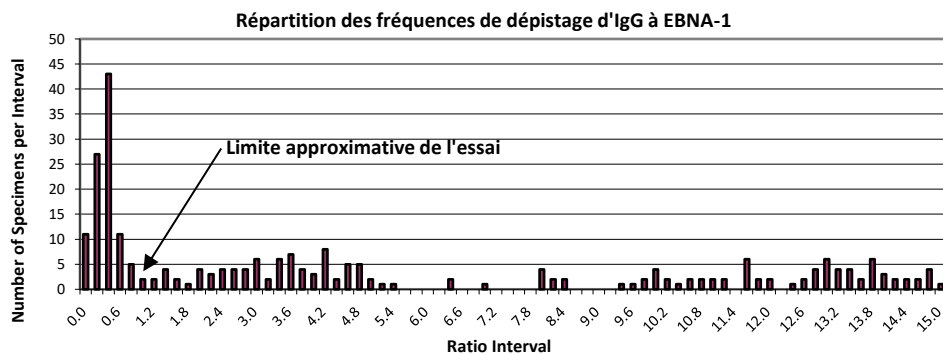


Figure 1 : Fréquence de distribution des résultats de la recherche clinique.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Étude comparative

Une étude comparative a été réalisée pour démontrer l'équivalence du système de test ZEUS ELISA EBNA-IgG par rapport à un autre système de test ELISA actuellement sur le marché, dans le cadre d'une recherche clinique sur deux sites. En résumé, un total de 271 échantillons ont été testés, 144 sur le site 1, et 127 sur le site 2. Les échantillons testés sur le site 1 incluaient 124 échantillons envoyés à un laboratoire de référence pour une sérologie de routine EBV, et 20 échantillons du service d'épidémiologie pédiatrique qui avaient été précédemment dosés négativement en EBNA. Les spécimens testés sur le site 2 incluent 100 échantillons qui devaient être testés pour une sérologie EBV de routine, 7 échantillons qui avaient été précédemment caractérisés comme VCA-IgM positifs, et 20 échantillons qui avaient été trouvés EBV négatifs. Le tableau 1 résume les résultats de cette étude comparative. Le tableau 2 met en évidence dans l'étude clinique une sous-population positive d'hétérophiles. Ce tableau inclut aussi les résultats d'EBV en VCA-IgG et VCA-IgM. De plus, il regroupe les données obtenues avec le kit ZEUS ELISA et le test ELISA de dépistage d'anticorps IgG à EBNA-1 vendu dans le commerce.

Tableau 1 : Résumé de la sensibilité et spécificité initiales

Test ELISA IgG à EBNA vend dans le commerce	Système de test ZEUS ELISA IgG EBNA-1				
		Positif	Négatif	Ambivalent*	Total
	Positif	169	10*	3	182
	Négatif	1*	86	0	87
	Ambivalent*	0	2	0	2
	Total				271

*Résultats ambivalents et discordants. Tous les pourcentages sont exprimés avec un intervalle de confiance à 95% calculé selon la méthode exacte.

Sensibilité relative = $169/179 = 94,4$ (90,0 à 97,3 %) Spécificité relative = $86/87$ (93,8 % à 100 %)

Concordance = $225/226 = 99,9$ (92,7 % à 97,9 %)

Analyse des résultats discordants

Treize (13) échantillons ont donné des résultats positifs avec le kit ELISA commercial, alors qu'ils sont donnés négatifs (n = 10) ou ambivalents (n = 3) avec le test ZEUS. 4/13 ont été confirmés discordants, et jugés EBNA négatifs via la méthode ACIF. 4/13 ont été confirmés discordants, et jugés EBNA négatifs via la méthode ACIF. 2/14 ont d'abord été ambivalents avec le test ELISA ZEUS, mais la répétition des essais a abouti au final à un résultat positif. 1/14 a été à plusieurs reprises équivoque avec le test ELISA ZEUS, et a donc été exclu du calcul final. 2/14 n'ont pas pu être confirmé à cause d'un volume insuffisant, et par conséquent ont été exclus des calculs finaux. Un (1) échantillon a été trouvé négatif avec l'ELISA commercial et positif avec le test ZEUS. Ce résultat a été confirmé discordant et jugé EBNA négatifs via la méthode ACIF. Deux (2) échantillons ont été initialement ambivalents avec la trousse ELISA commerciale. Après un nouveau test, 1/2 donne le même résultat avec les 2 trousse, et n'a donc pas besoin de test d'IF. 1/2 a été confirmé en tant que discordant, et jugé EBNA positif avec la méthode ACIF. **REMARQUE** : La détermination des échantillons discordants aboutit à un total de 176 échantillons positifs avec le kit ELISA commercial et 171 avec le kit ELISA ZEUS. 92 spécimens ont été trouvés négatifs avec le kit ELISA commercial, desquels 91 ont également été négatifs avec le kit ELISA ZEUS. Par conséquent, les résultats obtenus sont concordants pour 262 des 268 échantillons avec les deux systèmes de test.

Tableau 2 : Résultats de tous les échantillons positifs hétérophiles de l'étude clinique

ZEUS ELISA EBNA-1 IgG	EBNA ELISA commercial	ZEUS ELISA VCA IgG	Résultats hétérophiles	Test VCA IgM ELISA commercial
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Equivocal
Négatif	Négatif	Positif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Positif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Equivocal ^a	Positif	Positif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif ^b	Positif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif ^c	Positif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif ^d	Positif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Positif	Positif	Négatif
Positif	Positif	Positif	Positif	Négatif
Positif	Positif	Equivocal	Positif	Positif

^a Échantillon ambivalent de manière répétée

^b Positif en EBNA par ACIF au 1:5

^c Négatif EBNA par ACIF

^d Négatif EBNA par ACIF

2. Reproductibilité

La reproductibilité est mesurée suivant le protocole EP5-T2 : Evaluation of precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Second Edition (Évaluation de la précision du rendement des appareils de chimie clinique - deuxième édition), tel que publié par le National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Vilanova, PA. Des études de reproductibilité ont été menées sur les deux sites cliniques et au sein de Zeus Scientific, Inc, Raritan, NJ. En résumé, six échantillons ont été testés, deux échantillons fortement positifs, deux échantillons modérément positifs et deux échantillons négatifs. Chaque échantillon a été analysé en double, deux fois par jour (le matin et l'après-midi) chaque jour pendant 20 jours. Les données obtenues ont été utilisées pour calculer la précision intra-essai, la précision totale et le coefficient de variation, le cas échéant. Les résultats quotidiens comprenant les ratios résultant d'une erreur présumée de technique, ont été éliminés, et les statistiques ci-dessus ont été recalculées. Ces résultats sont résumés dans le tableau 3. Le tableau 4 montre l'étude de la reproductibilité du étalon passé en trois réplicats chaque jour pendant les 20 jours de l'étude de reproductibilité. Le étalon a été testé en trois exemplaires pour chaque essai. Pour chaque essai, la DO du étalon a été convertie en valeur d'indice. Il décrit les valeurs d'indice maximales et minimales pour les 60 valeurs de DO, le CV maximal et minimal des trois exemplaires des 20 essais et le CV global des 60 valeurs d'indice du étalon.

Tableau 3 : Résumé des tests de reproductibilité

ID	(Site)	Rapport moyen	Swr ^a	S ₁ ^b	Jours de test	% CV	Observations totales
Fortement positif 1	(1)	3,59	0,23	0,52	19	14,54	76
	(2)	4,08	0,19	0,36	20	8,71	80
	(3)	4,01	0,23	0,41	20	10,23	80
Fortement positif 2	(1)	3,66	0,36	0,59	19	16,18	76
	(2)	4,17	0,20	0,35	20	8,35	80
	(3)	3,98	0,15	0,32	19	8,18	76
Faiblement positif 1	(1)	2,37	0,09	0,35	19	14,81	76
	(2)	2,67	0,14	0,21	20	7,76	80
	(3)	1,88	0,17	0,20	18	10,67	72
Faiblement positif 2	(1)	2,12	0,18	0,30	19	14,08	76
	(2)	2,32	0,15	0,20	20	8,71	80
	(3)	2,18	0,11	0,17	16	7,69	64
Négatif 1	(1)	0,03	0,03	0,05	19	S. O.	76
	(2)	0,01	0,02	0,02	20	S. O.	80
	(3)	0,02	0,02	0,04	20	S. O.	80
Négatif 2	(1)	0,14	0,05	0,08	19	S. O.	76
	(2)	0,27	0,02	0,04	20	S. O.	80
	(3)	0,18	0,03	0,06	20	S. O.	80

^a Estimation ponctuelle de l'écart-type de précision intra-essai.
^b Estimation ponctuelle de l'écart-type de précision totale.

Tableau 4 : Reproductibilité du étalon en trois exemplaires

Site	Rapport élevé	Rapport bas	% CV élevé	% CV bas	% CV global
Site 1, 20 essais du matin	2,46	1,98	7,92	0,99	4,25
Site 1, 20 essais après-midi	2,54	1,87	12,26	0,37	4,44
Site 2, 20 essais du matin	2,49	1,85	12,07	1,62	6,66
Site 2, 20 essais après-midi	2,68	1,93	14,67	1,56	6,01
Site 1, 20 essais du matin	2,44	1,94	9,19	0,55	4,22
ZEUS, 20 essais après-midi	2,46	2,01	7,43	0,45	3,49

3. Réactivité croisée

Des études ont été réalisées pour évaluer les réactions croisées du test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBNA-1 en utilisant des sérums négatifs pour les anticorps EBNA et EBV-VCA et qui ont positifs pour :

HSV-1	n = 5
HSV-2	n = 4
VZV	n = 5
CMV	n = 2
Anticorps antinucléaires	n = 5

Cette étude comprenant 21 sérums énuméré ci-dessus montre qu'aucune réaction croisée n'a été détectée avec ces différents anticorps IgG et le test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBNA-1.

RÉFÉRENCES

1. Rapp CE and Hewetson JF: Infectious mononucleosis and the Epstein-Barr virus. Am. J. Dis. Child., 132:78-86, 1978.

2. Biggar RJ, Henle W, Fleisher G, Bocker J, Lennette ET, and Henle G: Primary Epstein-Barr virus infections in African infants; I. Decline of maternal antibodies and time of infection. Ing. J. Cancer, 22:239-234, 1978.

3. Fry J: Infectious Mononucleosis: Some new observations from a 15 year study. J. Family Prac., 10:1087-1089, 1980.

4. Lennette ET: Epstein-Barr virus, In: Manual of Clinical Microbiology, 4th Edition, Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1985.

5. Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET and Biggar RJ: Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: Clinical and Serologic observations. J. Infect. Dis., 139:553-558, 1979.

6. Merlin TL: Chronic mononucleosis: Pitfalls in the laboratory diagnosis. Human Path., 17:2-8, 1986.

7. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, and Pagano JS: Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N. Engl. J. Med. 310:1225-1230, 1984.

8. Chang RS, Lewis JP, Reynolds RD, Sullivan MJ and Neuman J: Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by patients with lymphoproliferative disorders and by recipients of renal homografts. Annals of Intern. Med. 88:34-40, 1978.

9. Jones JF, Ray G, Minnich LL, Hicks MJ, Kibler R, and Lucas DO: Evidence of active Epstein-Barr virus infection in patients with persistent, unexplained illness: Elevated anti-early antigen antibodies. Annals of Intern. Med. 102:1-6, 1985.

10. DuBois RE, Seeley JK, Brus I, Sakamoto K, Ballow M, Harada S, Bechtold TA, Pearson G, and Purtilo DT: Chronic mononucleosis syndrome. *South. Med. J.* 77:1376-1382, 1984.
11. Straus SE, Tosato G, Armstrong G, Lawley T, Preble OT, Henle W, Davey R, Pearson G, Epstein J, Brus I, and Blaese M: Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infection. *Annals of Intern. Med.* 102:7-16, 1985.
12. Tobi M, Ravid Z, Feldman-Weiss V, Ben-Chetrit E, Morag A, Chowers I, Michaeli V, Shalit M, and Knobler H: Prolonged atypical illness associated with serological evidence of persistent Epstein-Barr virus infection. *Lancet*, 1:61-63, 1982.
13. Evans AS, Neiderman JC, Cenabre LC, West B, and Richards VA: A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr virus-specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis: Specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *J. Infect. Dis.*, 132:546-554, 1975.
14. Henle W, Henle GE, and Horwitz CA: Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Human Path.*, 5:551-565, 1974.
15. Lennette ET and Henle W: Epstein-Barr Virus Infections: Clinical and serological features. *Lab Mgmt.* 23-28, June, 1987.
16. Fleisher G and Bolognese R: Persistent Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 147:982-986, 1983.
17. Sumaya CV: Serological testing for Epstein-Barr virus: Developments in interpretation. *J. Infect. Dis.* 151:984-987, 1985.
18. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Rudnick H, and Lutts E: Long-term serological follow-up of patients for Epstein-Barr virus after recovery from infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 151:1150-1153, 1985.
19. Horwitz CA, Henle W, Henle G, and Schmitz H: Clinical Evaluation of patients with infectious mononucleosis and development of antibodies to the R component of the Epstein-Barr virus-induced early antigen complex. *Am. J. Med.* 58:330-338, 1975.
20. Sumaya CV: Endogenous reactivation of Epstein-Barr virus infections. *J. Infect. Dis.* 135:374-379, 1977.
21. Henle G, Henle W, and Horwitz CA: Antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 130:231-239, 1974.
22. Henle W and Henle G: Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res.* 41:4222-4225, 1981.
23. Henle W, Ho H-C, Henle G, and Kwan HC: Antibodies to Epstein-Barr virus-related antigen in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long-term survivors. *J. Nat'l. Cancer Inst.* 51:361-369, 1973.
24. Larson PD, Bloomer LC, and Brag PF: Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology*, 35:435-438, 1985.
25. Akaboshi I, Jamamoto J, Katsuki T, and Matsuda I: Unique pattern of Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, 11:499-520, 1973.
26. Joncas J, Lapointe N, Gervais F, Leyritz M, and Wills A: Unusual prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus early antigen in ataxia telangiectasia. *Lancet*, 1:1160, 1977.
27. Reedman BM and Klein G: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, 11:499-520, 1973.
28. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 2nd edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
29. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
30. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. *Fed. Register* 56:64175-64182, 1991.
31. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

ZEUS ELISA et SAve Diluent* sont des marques de commerce de ZEUS Scientific

Système de dépistage d'anticorps IgG à EBNA-1

Si vous désirez une assistance clientèle aux États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.

Si vous avez besoin d'assistance technique aux États-Unis, veuillez contacter ZEUS Scientific au numéro de téléphone gratuit indiqué ou par courriel à support@zeusscientific.com.

Les clients ayant besoin d'assistance commerciale ou technique hors des États-Unis doivent contacter leur distributeur régional.

© 2017 ZEUS Scientific Tous droits réservés.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands